

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

DJELOVANJE ONEČIŠĆENJA NA MIKORIZNE GLJIVE

THE EFFECTS OF POLLUTION ON MYCORRHIZAL FUNGI

SEMINARSKI RAD

Vedran Bahun

Preddiplomski studij znanosti o okolišu

(Undergraduate Study of Environmental Sciences)

Mentor: prof. dr. sc. Goran Klobučar

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. ULOGA MIKORIZNIH GLJIVA U KOPNENIM EKOSUSTAVIMA	3
3. DJELOVANJE TOKSIKANATA NA MIKORIZNE GLJIVE	8
3.1.1. Toksi nost teških metala.....	8
3.1.2. Toksi nost pesticida.....	10
3.1.3. Toksi nost poliaromatskih ugljikovodika.....	11
3.1.4. Toksi nost produkata depozicije dušika	12
3.1.5. Toksi no djelovanje uslijed promjene pH tla	13
3.1.6. Toksi nost ozona i ugljikovog dioksida	15
4. TOLERANCIJA MIKORIZNIH GLJIVA NA DJELOVANJE METALA	16
5. LITERATURA.....	21
6. SAŽETAK.....	22
7. SUMMARY	22

1. Uvod

Gljive su heterotrofni organizmi kojima je za energiju i rast potreban ugljik. Tijekom evolucije su razvile tri različite trofičke strategije za opskrbu ugljikom, pa postoje kao saprotrofi, nekrotrofi i biotrofi (Slika 1.). Mikorizna simbioza je najstarija i najraširenija simbioza gljiva s biljkama. Pojam '*mykorrhiza*' prvi je upotrijebio A.B. Frank 1885. godine kako bi opisao modificirane korijenske strukture šumskoga drveća (Frank i Trappe, 2005). Otada pokriva itav niz mutualističkih simbiotskih zajednica gljiva i korijenja drveća (Finlay, 2008a). Navedene zajednice ključni su elementi procesa kruženja hranjivih tvari u kopnenim staništima (Cairney i Meharg, 1999). Glavni oblici mikoriza su endomikorize, gdje gljiva kolonizira unutrašnjost stanica korijena biljke domaćina (npr. erikoidne i arbuskularne mikorize (AM)), te ektomikorize (ECM) u kojima je gljiva smještena izvan stanica korijena biljke domaćina (Gadd, 2007). Različite biome naseljavaju različite skupine mikoriznih gljiva ija je evolucija potaknuta trenutnim uvjetima u okolišu. Nadalje, jasno je kako mikorizne zajednice mogu imati značajan utjecaj na strukturu biljnih zajednica. Na razini staništa, različite su zajednice ektomikoriznih, arbuskularnih i erikoidnih mikoriznih gljiva identificirane unutar korijenskih sustava biljaka domaćina (Slika 1.). Vjerojatno je da mnoge mikorizne gljive vrše različite ekološke funkcije, pa gubitak pojedine vrste u ukupnoj zajednici gljiva nužno ne mijenja primjetno funkcioniranje ekosustava niti njegovu produktivnost (iako se to ovisi o stupnju lokalne raznolikosti). Međutim, gubitak ekoloških funkcija određenih zajednica mikoriznih gljiva i zamjena drugim mikobiontima koji imaju različite ekološke funkcije može imati značajne posljedice za funkcioniranje i održivost ekosustava (Cairney i Meharg, 1999).



FUNGUS MICROBIOENHANCE

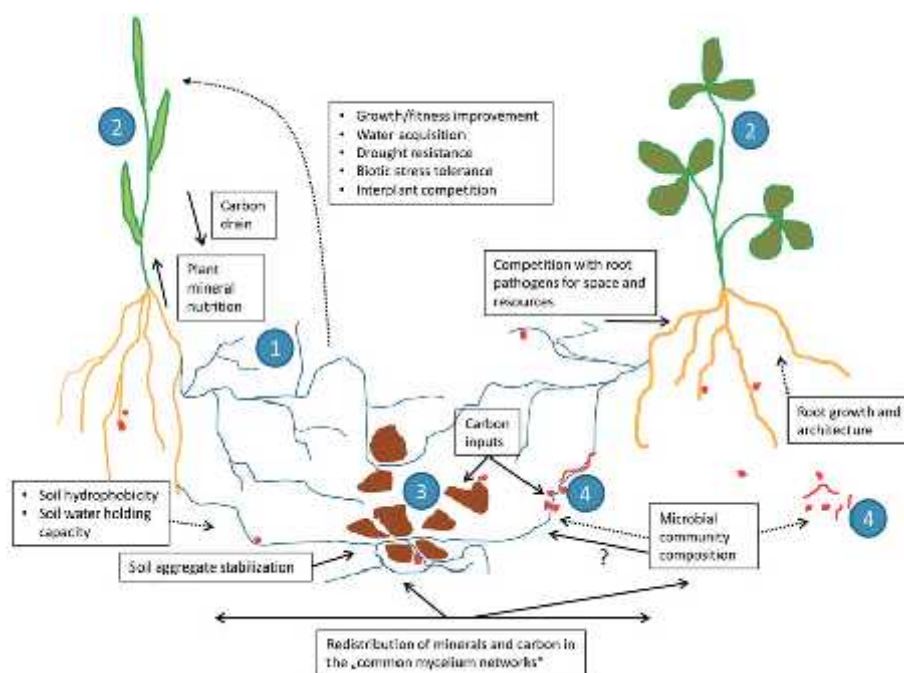
Slika 1. Podjela gljiva prema trofi koj razini i simbiotskim odnosima; izvor: www.slidehare.net

Ukupna razina infekcije ECM i AM gljivama (postotak kolonizacije) pod izraženim je utjecajem uvjeta u tlu (Cairney i Meharg, 1999). Mikorizne gljive izložene su razliitim oblicima okolišnog stresa. Oni uključuju različite fizičke, kemijske i biološke utjecaje. Među njima spadaju ekstremne temperaturne vrijednosti, pH, zasićenost kisikom, dostupnost vode i hranjivih tvari, fizička fragmentacija, toksični metali i drugi onečišivači. No, oni mogu biti i antropogeni oblici stresa koji proizlaze iz primjene gnojiva, vapna i pepela nastalog sagorijevanjem drva ili iz zasićenja ugljikovim dioksidom. Postoji više mogućih ishoda uslijed izlaganja mikoriznih gljiva stresnim uvjetima. Stresni faktori mogu neposredno djelovati na same mikorizne gljive ili posredno nastati kroz smanjenu raspodjelu asimilata biljke domaćina uzrokovanu odgovorima biljke na promjene u okolišu. S druge strane, mikorizne gljive mogu imati veliki stupanj tolerancije na stres kao i omogućiti toleranciju biljaka domaćina na stresne uvjete (Finlay i sur., 2008b).

Zabilježeni su mnogi slučajevi utjecaja antropogenog onečišćenja iz industrijskih i/ili gradskih izvora na ECM simbioze. Jasan dojam o utjecaju onečišćenja na mikorizne zajednice može se dobiti iz mnogobrojnih istraživanja koja su u obzir uzela utjecaj različitih onečišćivača, pojedinačno ili u kombinaciji, na kolonizaciju i strukturu zajednica mikoriznih gljiva u stakleni kim ili terestri kim sustavima (Cairney i Meharg, 1999). Cilj ovoga seminara je omogućiti pregled dosadašnjih spoznaja o djelovanju različitih tvari, prirodnog i/ili antropogenog podrijetla, na mikorizne gljive kao i njihovih mehanizama obrane od stresa uzrokovanog onečišćenjem.

2. Uloga mikoriznih gljiva u kopnenim ekosustavima

Mikorizne gljive i zajednice s oko 80% biljnih vrsta i uključene su u glavne transformacije minerala i preraspodjelu anorganskih hranjivih tvari, npr. esencijalnih metala i fosfata, kao i kruženje ugljika (Slika 2.). Imaju višestruku ulogu u kopnenim ekosustavima. Uzrokuju promjenu mobilnosti i dostupnosti hranjivih tvari i neesencijalnih metala, dušika, fosfora, sumpora itd. te promjenu kruženja i prijenosa ugljika između biljaka, gljiva i rizosfernih organizama. Također, sudjeluju u otapanju minerala i oslobađanju metala i hranjivih tvari iz minerala kao i preraspodjeli metala između biljaka i gljiva. Utječu na promjenu produktivnosti biljaka, promjenu biogeokemije i mikrobiološke aktivnosti u korijenskoj regiji biljaka te prijenos vode u i/ili iz biljke (Gadd, 2007).



Slika 2. Uloge mikoriznih gljiva u ekosustavima; izvor: www.frontiersin.org

Dokazano je da su mikorizne gljive uključene u mobilizaciju iz mineralnih resursa potaknutu protonom ili prisustvom liganda, imobilizaciju metala pomoću biosorpcije i akumulacije u biomasi te izvanstanično izlučivanje mikogenih oksalata toksičnih metala. Gljive rastu u mikrookolišu gdje su organizam, vezana ljepljiva sluz bilja, kruti adsorbenti te organske i anorganske površine u različitim medijima. Svi procesi koji doprinose trošenju stijena i minerala djelovanjem gljiva, kao što su otapanje, sorpcija, transport, difuzija i rekristalizacija mobiliziranih kationa, odvijaju se u tom mikrookolišu. Dva estetska sinergistička mehanizma kojim gljive razgrađuju mineralne supstrate su biomehanski i biokemijski. Biogeokemijske aktivnosti mikoriznih gljiva dovode do promjena fizičko-kemijskih karakteristika okoline korijena, a posljedica pojačanog trošenja minerala tla je oslobađanje kationa metala. Poznato je da ektomikorizne gljive otapaju kalcijeve minerale u tlu. Ektomikorizni miceliji reagiraju na prisutnost različitih silikatnih i fosfatnih minerala (apatita, kvarca, kalijevih feldspata) u tlu na način da reguliraju njihov rast i aktivnost, uključuju i kolonizaciju, preraspodjelu ugljika i zakiseljavanje supstrata. Erikoidne mikorizne i ektomikorizne gljive mogu otopiti mnoštvo minerala teških metala (npr. kadmija, bakra, zinka, olova) uključuju i fosfate. Mobilizacija fosfora se smatra jednom od najvažnijih funkcija mikoriznih gljiva. Slobodnoživuće i simbiotske gljive imaju važnu ulogu u nastanku minerala kroz izlučivanje organskih i anorganskih sekundarnih minerala te nukleaciju i depoziciju kristalinih materijala na i unutar stanica, posebice oksalata i karbonata. Navedeni proces može biti važan u tlu jer izlučivanje karbonata, fosfata i hidroksida povećava agregaciju tla. Kationi poput Si^{4+} , Fe^{3+} , Al^{3+} i Ca^{2+} , koji mogu biti oslobođeni mehanizmima trošenja, stimuliraju izlučivanje spojeva koji se ponašaju kao agensi za vezanje estica tla. Korijenje i hife mogu promijeniti položaj i međusobne odnose estica u rizosferi, promijeniti im orijentaciju i osloboditi organske metabolite koji pomažu stabilnosti agregata (Gadd, 2007).

Uz poboljšanje unosa mineralnih tvari kod biljaka, mnoge mikorizne gljive mogu imati važnu ulogu u mobilizaciji hranjivih tvari iz organskih supstrata. Glavni uzrok za biljke domaćine je mobilizacija hranjivih tvari kao što su dušik i fosfor iz strukturnih i drugih polimera koji su inače nedostupni korijenju biljaka. Izolacija dušika i fosfora pomoću mikoriznih gljiva iz raspona biološki relevantnih supstrata kao što su polen, mrtvi obliči, skokuni i saprotrofni miceliji već je temeljito proučena. Intervencija različitih skupina mikoriznih gljiva u mikrobnim mobilizacijsko-imobilizacijskim ciklusima uzrokuje mobilizaciju dušika i fosfora iz mikrobnog, mikro-faunskog, mezo-faunskog i biljnog

detritusa. Time je omogućen razvoj svojstvenih biljnih zajednica niz visinski gradijent ili gradijent geografske širine (Finlay, 2008a).

Drži se da negativni učinci ektomikoriznih gljiva na razgradnju, objašnjeni povećanjem razgradnje neto nakon uklanjanja mikoriznih gljiva okapanjem, ovise o kompeticiji za dušik ili vodu. Intervencija ektomikoriznih gljiva u ciklusima razgradnje vjerojatno uključuje kompetitivne međudnose sa saprotrofima. Pretpostavlja se da se jedne pojavljuju u blizini drugih, ali malo se zna o prostornoj ili vremenskoj dinamici međudnosa ovih dviju skupina gljiva u prirodnim ekosustavima. Saprotrofi s potpunim komplementom enzima za razgradnju detritusa potrebni su tijekom početnih stadija razgradnje. Dušik koji mobiliziraju zadržan je u njihovim micelijima. Kako se C:N omjer detritusa smanjuje, tako saprotrofi vjerojatno postaju manje kompetitivni u odnosu na mikorizne gljive koje se neposredno opskrbljuju asimilatima biljke domaćina (Finlay, 2008a).

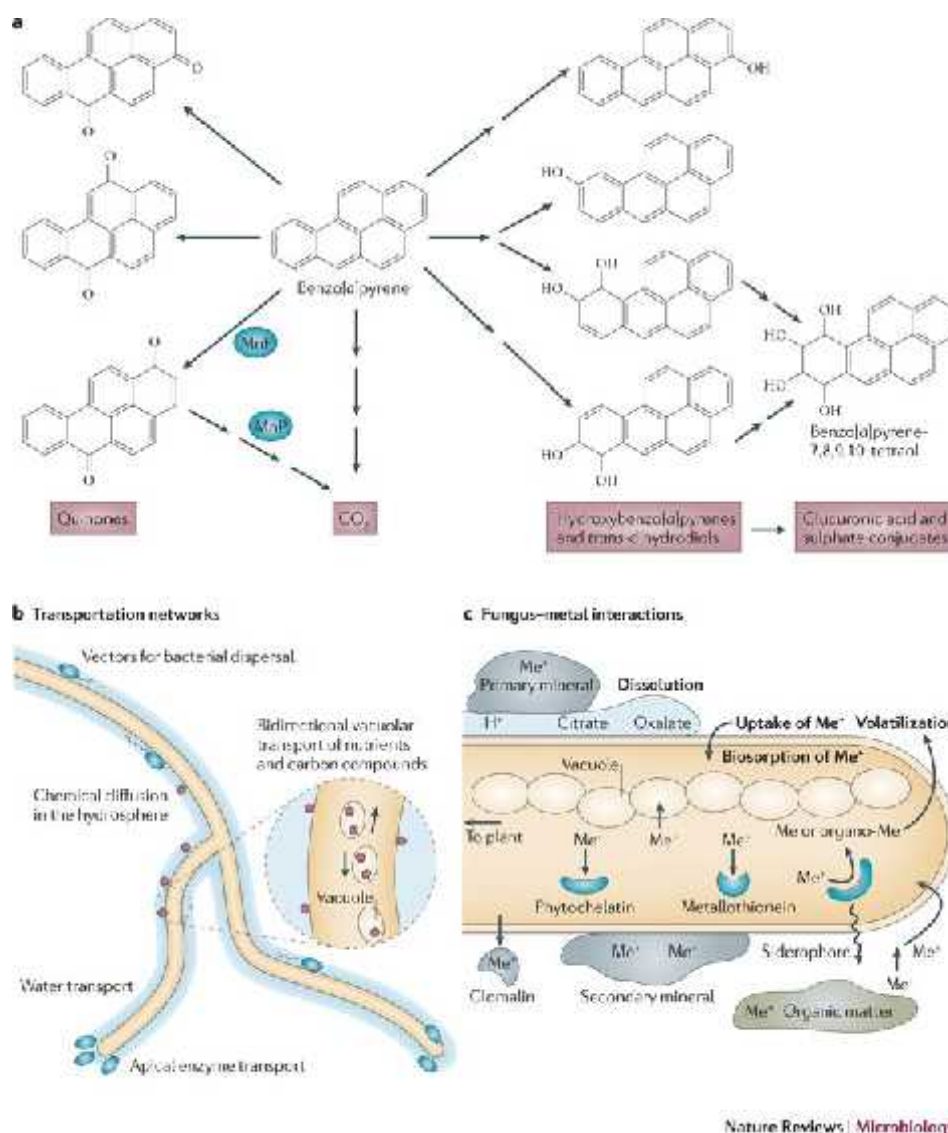
Gubitak energetski bogatih ugljikovih spojeva iz korijenja biljaka u mikrobne populacije u tlu temeljni je proces opskrbe ekosustava u tlu. Značajne količine ugljika protječu kroz mikorizne micelije do različitih sastavnica ekosustava u tlu. Utrošak za održavanje ektomikoriznih zajednica prema različitim autorima procijenjen je između 15% i 28% neto fiksacije ugljika. Osim neposrednog gubitka za respiraciju, energetski bogati ugljikovi spojevi osnova su za većinu bioloških procesa. Potrebne su daljnje informacije o količinama i tipovima različitih spojeva kao i mehanizama koji reguliraju njihovu translokaciju i krajnju raspodjelu. Potencijalni učinci uključuju proizvodnju enzima, organskih kiselina i drugih spojeva, utječu na razgradnju organskih supstrata ili otapanje mineralnih supstrata, i proizvodnju antibiotičkih tvari uključenih u kemijsku zaštitu ili antagonizam. Proizvodnja glikoproteina poput glomalina, koji su uključeni u stvaranje i stabilnost agregata tla, također mogu imati važan utjecaj na druge mikroorganizme povezane s micelijem arbuskularnih mikoriznih gljiva. Prijenos ugljika može se odvijati i između zelenih biljaka i nefotosintetskih miko-heterotrofnih biljaka koje dijele micelij. Preraspodjela svježih fotoasimilata kroz mikorizne micelije utječe na dinamiku hranjivih tvari i populacije mikroba u mikorizosferi. Neprekidnost fizioloških procesa i dinamička međuzavisnost sustava biljka-mikrob-tlo izazivaju širokoprihvaćen stav da je aktivnost tla pod dominacijom organizama razgradivača koji koriste stariji detritni materijal. Također, opovrgavaju da su podaci o korijenskom detritusu podjednaki onima o nadzemnom detritusu (Finlay, 2008a).

Dokazi uloga koje bi mikorizni miceliji mogli igrati u bioremedijaciji onečišćenja u tlu i dalje su proturječni. Mnoge ektomikorizne gljive koje su isprobavane u svrhu razgradnje perzistentnih organskih onečišćenja, kao što su polihalogenirani bifenili, poliaromatski

ugljkovodici, klorinirani fenoli i pesticidi, sposobne su promijeniti ove spojeve, ali relativno je malo mikoriznih taksona dosada testirano. Potencijalna prednost korištenja mikoriznih gljiva u bioremedijaciji je činjenica da se opskrbljuju ugljikom neposredno preko biljaka domaćina i koriste ga za širenje u one istone supstrate. Dio tog ugljika može tako postati dostupan bakterijama povezanim s mikoriznim micelijem što može imati posljedice za bioremedijaciju u mikorizosferi. Pokušaji uvođenja mikroorganizama s biokontrolnim i bioremedijacijskim svojstvima često budu neuspješni jer se inokulanti ne uspiju razviti. Mikorizne hife mogu olakšati razvoj nekih bakterija koje mogu biti aktivne u bioremedijaciji, npr. naftom one istone tala. Općenito, uloga arbuskularnih mikoriznih gljiva manje je istraživana s obzirom na bioremedijaciju, ali provedena istraživanja pokazala su da raspršenje policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH-ova) može biti pojačano u prisutnosti arbuskularnih mikoriza (Finlay, 2008a).

Mikorizne gljive imaju velik broj učinaka koji doprinose ublažavanju različitih tipova stresa kojemu su izložene njihove biljke domaćini, uključujući i toksičnost metala, oksidativni stres, vodni stres i uštinu zakiseljavanja tla (Slika 3.). Sposobnost ektomikoriznih gljiva da zadrže katione baza i ograniče njihov gubitak ispiranjem te da oslobode hranjive tvari trošenjem površina minerala može biti važna u tlima pod utjecajem zakiseljavanja. U takvim tlima toksičnost za posljedicu povišenih koncentracija aluminija i drugih toksičnih metala može se smanjiti povećanom proizvodnjom kelatnih agensa kao što je oksalna kiselina. Općenito, gljive tolerantne na metale rastu i otapaju toksične metale bolje nego netolerantni izolati. Također, toksični metali mogu uzrokovati oksidativni stres i rezultati više istraživanja mikoriznih gljiva pokazali su da gljive mogu regulirati gene koji pružaju zaštitu od reaktivnih kisikovih radikala (*reactive oxygen species*, ROS). Dokazano je da funkcionalna arbuskularna mikorizna CuZn superoksid dismutaza može pružati zaštitu od lokaliziranih obrambenih odgovora domaćina, uključujući i ROS. Druga su istraživanja ukazala na sposobnost ektomikoriznih gljiva za poboljšanje zaštite od metalima induciranog oksidativnog stresa kroz jako induciranu sintezu glutationa. Međutim, malo se zna o tome kako se tolerancija gljiva na metale odražava na prijenos metala u biljku domaćina. Znanstvenici su i dalje tek na početku razjašnjenja molekularnih mehanizama uključujući u homeostazu metala, detoksikaciju i toleranciju filamentoznih gljiva. Usto, mnogo se raspravljalo o učincima mikoriznih gljiva na odgovore biljaka na sušni stres. No, teško je razlikovati prehrambene učinke od neposrednih učinaka na prijenos vode pošto doprinos hifa unosu hranjivih tvari postaje važniji što je tlo suše. No, na translokaciju vode iz korijenja biljke u mikorizne gljive u vezi je s hidrauličkim potiskom. Opskrba vodom na ovaj način bila bi važan način održavanja mikorizne aktivnosti i

poboljšanja unosa hranjivih tvari pomoću biljaka duboka korijena, čak i kada su gornji slojevi tla suhi. U inke mikoriznih gljiva na toleranciju na vodni stres teško je proučavati pošto je opskrba slabo raspršivim hranjivim tvarima kao što je fosfor u suhom tlu postati sve više ograničena povećanom zavojitošću puta difuzije. Mikorizne hife daju vrlo važan doprinos unosu fosfora kako se tlo suši, smanjuju i razlike između u inaka vode i hranjivih tvari. Utišavanje ekspresije gena koji kodiraju akvaporine plazmatske membrane može igrati ulogu u povećanoj toleranciji AM biljaka na vodni i solni stres (Finlay, 2008a).



Slika 3. Specifični odgovori mikoriznih gljiva na stres uzrokovan nekim tvarima iz okoliša; izvor: www.nature.com

Uz povećanje apsorpcijske površine korijenskih sustava biljaka domaćina, hife simbiotskih gljiva osiguravaju veću površinu za interakcije s drugim mikroorganizmima i pripremaju važan put za translokaciju energetski bogatih biljnih asimilata u tlo. Interakcije mogu biti sinergističke, kompetitivne ili antagonističke i mogu biti od značaja za primjenu u područjima kao što su održiva poljoprivreda, biološki nadzor i bioremedijacija. Otkrivene su bakterije s potencijalom za fiksaciju dušika koje endosimbiontski rastu unutar porastog korijenja ektomikoriznih biljaka. Očigledno bi takve trojne simbioze bile od značaja u dušikom ograničenim sredinama. Lučenje i reapsorpcija fluidnih kapljica na vršcima ektomikoriznih hifa mogu predstavljati važan mehanizam za prilagodbu uvjetima u blizini vrhova hifa, stvaraju i suptilne razmjenu hranjivih tvari i ugljikovih spojeva s okolnim tlom i njegovim mikroorganizmima. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razlučile aktivnosti samih mikoriznih hifa i olakšan unos spojeva mobiliziranih aktivnošću u drugih organizama. Diferencijalna vezanost različitih taksona bakterija za vitalne i nevitalne hife gljiva ukazuje na to da neke bakterije funkcioniraju isključivo kao saprotrofi, hrane se mrtvim hifama, dok druge više ovise o interakcijama s živim hifama (Finlay, 2008a).

3. Djelovanje toksikanata na mikorizne gljive

3.1. Toksičnost teških metala

Mnogo se zna o utjecaju metala na mikorizne gljive kao i o odgovorima gljiva koji uključuju modifikacije odgovora biljaka domaćina. Općenito, gljive tolerantne na metale rastu i otapaju minerale toksičnih metala bolje nego netolerantni izolati. Otapanje metala djelovanjem gljiva može se odvijati protonom ili ligandom potaknutim mehanizmima, a organske kiseline osiguravaju izvor protona za otapanje i kelatne anione za stvaranje kompleksa iz kationa metala. Pokazalo se da povećana proizvodnja organskih kiselina, naročito oksalne kiseline, kod ECM gljiva kao odgovor na povišene koncentracije Al i Cu može imati ulogu u zaštiti biljaka od toksičnih učinaka ovih metala (Finlay i sur., 2008b).

Gljive mogu reagirati na toksične metale i minerale metala na mnoštvo načina ovisno o njihovoj toleranciji i sposobnosti da utječu na mobilnost toksičnih metala. Metali mogu biti mobilizirani od strane gljiva protonolizom, kompleksacijom pomoću mikrobnih metabolita (npr. polifenolnih spojeva) i siderofora te metilacijom kojom mogu nastati lako ishlapivi spojevi metala. Organske kiseline osiguravaju i protone za otapanje i kelatne anione za stvaranje kompleksa iz kationa metala što ovisi o imbenicima poput relativnih koncentracija aniona i metala, pH i konstanti stabilnosti različitih kompleksa. Suprotno tome, imobilizacija

može proiza i iz sorpcije na stani ne sastavnice ili egzopolimere, prijenosa i unutarstani ne izolacije ili izlučivanja u obliku netopljivih spojeva, npr. oksalata. Proučavana je sposobnost erikoidnih mikoriznih i ektomikoriznih (ECM) gljiva za otapanje minerala različitih toksičnih metala (Cd, Cu, Pb, Zn). Istraživanje je provedeno tako da su minerali bili uklopljeni u agarni medij i otapanje se procjenjivalo mjerenjem rasta na agaru nakon rasta gljiva. Mjerenje radijalnog rasta i težine suhe biomase dalo je nagovještaj tolerancije metala: metal u biomasi mjerio se atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom. Tolerancija na metale i sposobnost otapanja znatno su varirale ovisno o promatranom mineralu i vrstama gljiva kao i vrstama uzetih s lokacija različitog stupnja onečišćenja metalima. Pokazalo se da cinkov fosfat ima najmanju toksičnost i većinu ga je proučavanih izolata gljiva bilo najlakše otapati. Otapanje minerala toksičnih metala bilo je povezano s pH vrijednošću u medija te rastom i tolerancijom gljiva. Čini se da je zakiseljavanje medija bilo glavni mehanizam otapanja minerala za većinu istraživanih mikoriznih gljiva. Vrlo izražen letalni učinak zapažen je kod ektomikoriznih izolata (60% vrsta) u prisutnosti olovjeva fosfata, karbonata, sulfida i tetraoksida. Suprotno tome, izolati erikoidnih mikoriznih gljiva bili su sposobni rasti na medijima obogaćenim olovjevim mineralima. Značajan broj ECM kultura (70-90%) otapao je kadmijeve i bakrove fosfate i kuprit. Nijedna od erikoidnih i ektomikoriznih gljiva nije mogla proizvesti istu zonu u agaru s olovjevim mineralom. Međutim, mnoge su gljive bile sposobne akumulirati mobilizirano olovo u svoje micelije. Razlike u toleranciji na toksične metale, otapanju minerala i unosu minerala unutar populacija izoliranih iz onečišćenih i kontrolnih lokacija odnosile su se na toksični metal koji je bio glavni onečišćivač u originalnom onečišćenom okolišu (Fomina i sur., 2005).

S obzirom da zakiseljavanje tla povećava stopu otapanja minerala i oslobađanje potencijalno toksičnih metala iz netopljivih kompleksa, teško je jasno razlikovati učinak zakiseljavanja tla od učinaka toksičnih metala. Primjerice, povećana dostupnost aluminija, zajedno s ispiranjem kationa baza, pri niskim vrijednostima pH tla drži se jednim od važnih čimbenika u djelovanju kiselih kiša na rast biljaka. Podaci dobiveni istraživanjima na terenu i u staklenicima dokazuju kako je smanjena infekcija biljaka ECM gljivama posljedica onečišćenja Cd, Cu, Ni, Pb i/ili Zn, s time da se infekcija sve više smanjuje kako koncentracije metala rastu. Čak i kada postotak kolonizacije nije pod utjecajem toksičnih metala, cink (ako ne i drugi metali) može utjecati na ECM simbioze inhibirajući rast izvanmatričnih micelijskih sustava. Iako, čini se da učinak ovisi o taksonima izloženih gljiva. Povećanje koncentracija olova u tlu može imati različite učinke na različite ECM morfotipove. Dok su mnogobrojna istraživanja u staklenicima zabilježila smanjenu AM

kolonizaciju u prisutnosti one i š njega toksi nim metalima, relativno malo takvih istraživanja je provedeno u prirodi (Cairney i Meharg, 1999).

3.2. Toksi nost pesticida

Prou avani su u inci pesticida na 64 ektomikorizne gljive u mikorizi s drve em borealnih šuma *in vitro* metodama. Pesticidi (fungicidi: benomil, klorotalonil, bakrov oksiklorid, maneb i propikonazol; herbicidi: klortiamid, glifosat, heksazinon, linuron i terbutilazin; insekticidi: cipermetrin) odabrani su kao oni esto korišteni u nordijskim šumskim rasadnicima i mjestima pošumljavanja. Op enito, fungicidi su se pokazali toksi nijima za ektomikorizne gljive nego herbicidi i cipermetrin. Fungicidi, klorotalonil i propikonazol, imali su najizraženiji inhibicijski u inak na rast mikoriznih gljiva. Suprotno tome, maneb, glifosat i terbutilazin, stimulirali su rast nekih mikoriznih gljiva. *Leccinum versipelle* (Fr. & Hök) Snell 1944 i *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray 1821, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. 1838 i *Cenococcum geophilum* Fr. 1829 bile su mikorizne gljive najosjetljivije na razli ite pesticide. Otopina pesticida ili njihovi ostaci mogu natopiti posudu ili tlo tijekom ili nakon primjene zbog navodnjavanja ili kišnice. Dubina tla do koje pesticid može doprijeti ovisi o sastavu organske tvari u tlu i fizi ko-kemijskim svojstvima pesticida. U tresetnim loncima pesticidi mogu biti vezani za tresetni medij i samo se mala koli ina može detektirati u procjednoj vodi. Primjerice, istraživanje sa sadnicama u tresetnim loncima pokazalo je da se manje od 1% primijenjenog klorotalonila, ali gotovo 30% primijenjenog propikonazola procijedilo kroz tresetni medij. Mikrobna aktivnost u tlu može osloboditi za tlo vezane pesticide te oni ponovno prolaze kroz interakcije u okolišu. Prema tome, mikoriza i micelij, koji su prisutni pretežno u organskom najgornjem sloju tla, mogu biti izloženi pesticidima. Testirani fungicidi pokazali su se toksi nima za ektomikorizne gljive, vjerojatno zbog njihovog op eg na ina djelovanja. Fungicidi mogu inhibirati diobu stanica gljiva (benomil), oslabiti biosintezu ergosterola (propikonazol), inaktivirati tiole stanica gljiva (klorotalonil), uzrokovati ošte enja proteina (bakrov oksiklorid) ili se vezati na bakrove spojeve (maneb). Recimo, propikonazol, sustavni fungicid, spada u grupu inhibitora sinteze sterola te ima širok raspon djelovanja. Herbicidi, glifosat i heksazinon, testirani su s razli itim gljivama u testovima istih kultura, npr. *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quél. 1872, *Laccaria laccata* laccata (Scop.) Cooke 1884 i *Suillus tomentosus* (Kauffman) Singer 1960. Inhibirali su sve testirane gljive pri koncentracijama iznad 10 mg/L, a u drugome eksperimentu imali su inhibicijski u inak na *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma longicaudum* (Fr.) P. Kumm. 1871 i *Pisolithus tinctorius*

(Mont.) E. Fisch. 1900 pri koncentracijama ispod 100 mg/L, iako tako visoke koncentracije mogu biti manje relevantne za situaciju u šumskim rasadnicima (Laatikainen i Heinonen-Tanski, 2002).

3.3. Toksi nost poliaromatskih ugljikovodika

Poliaromatski ugljikovodici (PAH-ovi) toksi ni su, i sveprisutni one iš iva i okoliša koji dospijevaju u okoliš prirodnim putem ili se osloba aju u velikim koli inama razli itim industrijskim procesima. Zbog toga neka tla u blizini industrijskih postrojenja mogu postati izrazito one iš ena PAH-ovima, posebno ona pod utjecajem industrije rasplinjavanja ugljena i izljeva nafte koji uslijede (Cairney i Meharg, 1999). Imaju štetne u inke na ljudsko zdravlje i okoliš. Dokazano je da PAH-ovi imaju izravan toksi an u inak na razvoj AM gljiva ometaju i metabolizam lipida. Prisutnost PAH-ova utje e na drasti no ograni enje duljine izvankorijenskih hifa i proizvodnje spora. Zna ajno smanjenje sastavnica stani ne membrane, fosfatidilkolina (PC) i sterola (osobito 24-metilkolesterola), prikazani su na primjeru rasta *Rhizopagus irregularis* Blaszk., Wubet, Renker & Buscot 2009 u prisutnosti PAH-ova. Štoviše, izloženost PAH-ovima uzrokovala je oksidativni stres u AM izvankorijenskim strukturama istaknut porastom lipidne peroksidacije. Obje lipidne sastavnice membrane, steroli i PC, pod izraženim su u inkom djelovanja PAH-ova na što ukazuje ošte enje membrane gljiva u prisutnosti B[a]P-a i antracena. Ova je pretpostavka potvr ena porastom lipidne peroksidacije kad su AM gljive rasle uz one iš enje PAH-ovima. Sve uo ene promjene bile su manje u prisutnosti antracena koji se pokazao manje toksi nim od benzo[a]pirena (B[a]P-a). Uzimaju i sve u obzir, drasti no smanjenje rasta AM gljiva uz one iš enje PAH-ovima može se djelomi no objasniti smanjenjem akumulacije sterola, PC i lipidne peroksidacije (Debiane i sur., 2011).

Istraživanja propagula AM gljiva op enito ukazuju na smanjenu raznolikost u otpadu nastalom sagorijevanjem ugljena i jalovini iz rudnika lignita ili kalcita u usporedbi s nezaga enim tlima. Promjene u populacijama AM gljiva mogu se javiti i zbog primjene otpadnih voda iz nastalih procesuiranjem uljnih šejlova na tlo u travnja kom ekosustavu velike ameri ke komoljike. Iako teški za interpretaciju, uo eni u inci vjerojatno prije odražavaju utjecaj organskih zaga iva a u otpadnoj vodi nego anorganskih sastojaka pošto se sastav anorganskih hranjivih tvari u tlu vratio gotovo na vrijednosti prije one iš enja u vrijeme kada je istraživanje provedeno (Cairney i Meharg, 1999). Važnost remedijacije PAH-

ovima one iš enih tala leži u o uvanju korisnih mikroorganizama u tlu poput mikoriznih gljiva (Debiane i sur., 2011).

3.4. Toksi nost produkata depozicije dušika

Dosadašnja istraživanja upu uju na to da depozicija dušika može dovesti do smanjenja kolonizacije ECM gljiva ili smanjenja ukupnog broja korijena inficiranih ECM gljivama. Potonje je obi no povezano s ukupnim smanjenjem u kratkom bo nom korijenju. Me utim, smanjenje kolonizacije ovakvog tipa može biti kratkoga vijeka. Nadalje, pokazalo se da gnojidba dušikom nema zna ajan u inak na obnavljanje vrhova korijena inficiranih ECM gljivama. Kolonizacija erikoidnih biljnih vrsta iz brdskih krajeva sjeverne polutke pokazuje slab odgovor na gnojidbu dušikom – istraživanja pokazuju slab ili nikakav u inak na postotak kolonizacije ili ukupnu biomasu mikoriznih gljiva povezanu s korijenskim sustavima ak i nakon etiri godine neprekidne gnojidbe. Sli no tome, postotak kolonizacije nekih stepskih AM vrsta može biti smanjen zbog gnojidbe amonijevim sulfatom, iako druge vrste ne moraju pokazati vidljiv odgovor. U specifi nom slu aju oboga ivanja amonijakom, razina kolonizacije AM gljiva može se zna ajno pove ati, a na kolonizaciju ECM gljiva može negativno utjecati. Dodatak dušika može imati snažne u inke na podzemnu strukturu zajednica ECM gljiva. Vrsta dušika primijenjenog na tlo može razli ito utjecati na strukturu zajednice ECM morfotipova; i urea i amonijev nitrat imaju razli ite u inke. Promjene u zajednicama ECM gljiva posredovane dušikom mogu imati dugoro an ekološki zna aj. Razli it utjecaj dušikih dodataka može biti povezan s u incima na rast izvanmatri nog micelija razli itih taksona ECM gljiva. Tako er, postoje i razlike unutar pojedine vrste u osjetljivosti ECM izvanmatri nih micelijskih sustava na dodatak dušika. Rast nekih gljiva kroz tlo može biti pod izraženim utjecajem unosa dušika, dok se druge ine relativno neosjetljivima. Ovakve razlike vjerojatno snažno utje u na relativnu konkurentnost ECM gljiva i mogu poduprijeti promjene u strukturi podzemnih zajednica vezane uz one iš enje dušikom (Cairney i Meharg, 1999).

ini se da je ve ina ECM gljiva jako osjetljiva na abioti ke promjene u okolišu. Posebno, kroni no i/ili drasti no pove anje dostupnosti dušika, uzrokovano depozicijom ili dodavanjem dušika, može dovesti do dramati nih gubitaka u raznolikosti vrsta te bitno promijeniti strukture ECM zajednica. Uzevši u obzir injenicu da su ECM zajednice u okolišu ograni enom dušikom najšire razvijene mogu se o ekivati odgovori na dostupnost dušika. Dok su članovi roda *Cortinarius*, vrstama najbogatijeg roda s otprilike 2000 vrsta, obi no vrlo

osjetljivi na dodavanje dušika i često odsutni na gnojnim šumskim zemljištima, zastupljenost vrsta roda *Lactarius* često se povećava poslije gnojidbe. Još je nejasno je li relativno est gubitak raznolikosti ECM gljiva poslije gnojidbe dušikom uzrokovan izravnim stresnim u inkom na gljive ili neizravnim u inkom preko biljke domaćina, smanjuju i opskrbu gljive ugljikom. Razvoj micelija kod nekih ECM gljiva pod negativnim je utjecajem povišene razine dušika u tlu. ECM gljive ne mogu ograničiti unos dušika, pa prekomjerni unos može dovesti do smanjenja rasta micelija zbog toga što je ugljik koji se inače koristi za širenje hifa prenamijenjen za asimilaciju unesenog dušika. Gnojidba šuma dušikom obično se provodi primjenom oko 100–200 kg N ha⁻¹ u obliku amonijeva nitrata. U više je navrata zapaženo kako nitrati mogu biti toksični za ECM gljive. U nedavnim istraživanjima proučavano je korištenje različitih izvora dušika u ECM gljiva. Stvaranje mikorize i razvoj *Suillus variegatus* (Sw.) Kuntze 1898, uobičajene vrste u zajednici s borom *Pinus sylvestris* L., bili su pod izraženim negativnim utjecajem u prisutnosti nitrata. U inak je bio isti slučaj i u slučaju izloženosti amonijaku ili organskim izvorima dušika kao alternativnim izvorima dušika. Kronično dodavanje dušika zračnom depozicijom dušika također je povezano sa smanjenjem proizvodnje sporokarpa u europskim šumama. Bogatstvo vrsta ECM gljiva, mjereno proizvodnjom sporokarpa, pod negativnim je utjecajem povećanja depozicije dušika. Također, zaključeno je kako je utjecaj na specijalističke vrste (posebno simbiote iglastih golosjemenjaka) negativniji nego na generalističke vrste koje su sposobne stvarati mikorize s velikim brojem biljaka domaćina. Što se tiče AM gljiva, pokazalo se da uinci gnojidbe ovise o početnom statusu hranjivih tvari ekosustava kao i vrstama mikoriznih gljiva. Sastav biljnih zajednica može utjecati na strukturu zajednica AM gljiva, ali poznato je i da raznolikost zajednica AM gljiva može utjecati na raznolikost i produktivnost biljnih zajednica (Finlay i sur., 2008b).

3.5. Toksično djelovanje uslijed promjene pH tla

Sporo zakiseljavanje tla pod brojnim tipovima vegetacije, naročito pod vrstama iglastih golosjemenjaka, prirodan je proces i biljke su razvile različite mehanizme tolerancije ili izbjegavanja nastalog stresa. Međutim, taloženje mnogih antropogenih onečišćivača značajno je povećalo zakiseljavanje tla. U područjima sjeverne Europe, gdje podloga ima mali pufer kapacitet, snižavanje pH tla prepoznato je kao potencijalno važna prijetnja za dugoročan opstanak šumskih ekosustava. Povećanje kiselosti tla povećava otapanje i mobilnost mnogih potencijalno toksičnih metala, posebno aluminija, te uzrokuje ispiranje kationa baza.

Me utim, ispiranje ovih kationa može se smanjiti u prisutnosti raširenog izvankorijenskog micelija ECM gljiva. Dok povećanje kiselosti i dostupnosti toksina metala vjerojatno utječe na mikorizne gljive u šumama, predložene protumjere poput vapnjenja, poduzete su kako bi se smanjila kiselost tla. No, otkriva se da bi one mogle potaknuti najavu i odgovor na stres kod gljiva i drugih biotičkih organizama u tlu. U većini borealnih i listopadnih šuma umjerenoga pojasa, gdje su mikorizne gljive prilagođene prevladavajućim uvjetima pH, čini se da je vapnjenje neizbježno predstavljati stres koji značajno mijenja sastav i strukturu zajednice. Suprotno tome, u većini umjerenih smanjenja pH tla vjerojatno su manje drastične. Zabilježen je značajan broj „nuspjava“ nakon vapnjenja i čini se da je većina povezana s odgovorom biotičkih organizama u tlu na dramatično povećanje pH tla kao prateće posljedice vapnjenja. Povećane stope razgradnje dovode do povećanog gubitka ugljika; više razine dostupnosti amonijaka isto mogu dovesti do povećane nitrifikacije i ispiranja nitrata u podzemne vode. Dok ovi odgovori mogu djelomično odražavati fiziološku plastičnost u postojećim organizmima, također, dobro je dokumentirano da vapnjenje može dramatično promijeniti strukturu i sastav zajednica gljiva. Korištenjem morfološke i/ili molekularne identifikacije ECM gljiva na vrhovima korijenja potvrđeno je da vapnjenje može radikalno promijeniti sastav vrsta. Me utim, premalo je istraživanja provedeno da bi se moglo predvidjeti kako će zajednica ECM gljiva odgovoriti na dodatak vapna. No, jasno je da reakcija ovisi o prisutnoj vrsti i da su u većini vapna dugotrajni. Primjerice, *Piloderma fallax* (Lib.) Stalpers 1984 je uobičajena ECM gljiva u kiselim tlima borealnih šuma i pokazuje naročito jaku reakciju na povećanje pH tla. Kada je micelij ove gljive bio izazvan s organskom tvari sakupljenom ili s kontrole ili s mjesta koja su bila vapnjena prije 15 godina, rast u vapnjenom materijalu bio je vrlo ograničen. Utvrđeno je da je raspodjela ugljika u miceliju bila značajno veća u kontrolnom supstratu nego u vapnjenom supstratu. Miceliji ECM gljiva važni su u kolonizaciji novih vrhova korijenja i prema tome važan su čimbenik kompetitivne sposobnosti ECM gljiva. Bilo koja smetnja, poput vapnjenja, koja utječe na rast ECM gljiva u tlu stoga mora promijeniti kompetitivne interakcije među vrstama. Taksoni prilagođeni uvjetima višeg pH tla rastu na trošak taksona ovisnih o niskom pH tla. Vapnjenje smrekove šume u južnoj Švedskoj s 8,75 tona ha⁻¹ dolomita imalo je za ishod zamjenu zajednice ECM gljiva s taksonima koji se inače ne pronalaze u tim uvjetima. Nije objašnjeno da li se taksoni koji preferiraju vapnjenje prirodno pojavljuju u ovim šumama, preživljavaju i u šumama na mjestima mikroskopskih dimenzija s visokim pH, ali ispod razina detekcije, ili migriraju na mjesto u obliku spora s okolnih mjesta s visokim pH. Primjena pepela nastalog sagorijevanjem drva u šumskim ekosustavima predložena je kao mjera barem djelomično

nadomještanja hranjivih tvari uklonjenih tijekom kr enja šuma. Pepeo nastaje izgaranjem biogoriva i skupo ga je zbrinjavati na odlagalištima otpada. Stoga, vra anje pepela u šumu predstavlja i na in na koji esencijalne hranjive tvari mogu biti nadomještene i prakti no rješenje za zbrinjavanje ovoga nusproizvoda. Me utim, pepeo sadrži makronutrijente Ca, P, K i Mg te mikronutrijente B, Cu i Zn, ali može biti i visoko bazi an (pH izme u 10 i 13). Tako er, pepeo može sadržavati velike koli ine teških metala. Vrlo je malo istraživanja provedeno u svrhu prou avanja u inka dodatka pepela na mikorizne gljive. Zaklju ak tih istraživanja je da je malo vjerojatno da razine hranjivih tvari u pepelu imaju velik utjecaj na zajednicu ECM gljiva. No, može se o ekivati da e potencijalne promjene pH tla uzrokovane dodatkom pepela imati mjerljive u inke (Finlay i sur., 2008b).

3.6. Toksi nost ozona i ugljikovog dioksida

Dok su neutralni ili ak pozitivni u inci na ukupnu kolonizaciju zapaženi nakon kratkoro nog izlaganja ili izlaganja niskoj koncentraciji ozona, negativni u inci javljaju se pri dugoro nom izlaganju ili izlaganju višim koncentracijama. Prema tome, podaci iz ve ine istraživanja ukazuju na zna ajan pad u postotku infekcije ECM gljivama nakon izlaganja ozonu. Ovo može biti popra eno smanjenjem koli ine asimilata u gljivama. Smanjena infekcija ECM gljivama može biti popra ena morfološkim ošte enjem plaštanih hifa. Iako, pošto ozon ne prodire kroz površinu tla, ini se da su njegovi u inci na ukupnu razinu infekcije ECM gljiva povezani s neizravnom redukcijom fotosinteze i premještanjem ugljikohidrata u korijen. Nekoliko je istraživanja uzelo u obzir mogu e interaktivne u inke izme u ozona i drugih one iš iva a; me utim, dosadašnji rezultati su pomalo dvosmisleni. Nije prona en interaktivni u inak izme u ozona i kiselih oborina na infekciju igli astih golosjemenja a ECM gljivama, a ipak otkrivena je interakcija, ali samo kad je pH kiseline kojom se tretiralo bio niži nego u eksperimentalnom tlu. Istraživanja mogu ih u inaka uslijed interakcija ozona i SO₂ dala su dvozna ne rezultate – uo eno je zna ajno smanjenje ECM kolonizacije ili nije bilo vidljivog u inka (Cairney i Meharg, 1999).

Pokazalo se da oboga enje atmosferskim CO₂ esto pove ava postotak kolonizacije ECM gljiva u igli astim golosjemenja ama i cvjetaju em širokolisnom drve u, iako odgovor može biti kratkoga vijeka u nekih biljaka doma ina. Stvar se dalje komplicira zapažanjem smanjene ECM kolonizacije uz povišenu koncentraciju CO₂ u nekim primjerima i injenicom da hranjive tvari i/ili status vlažnosti tla kao i temperatura zraka mogu utjecati na ukupne odgovore mikorize na CO₂. Me utim, u nekim slu ajevima, dok je zapažena pove ana

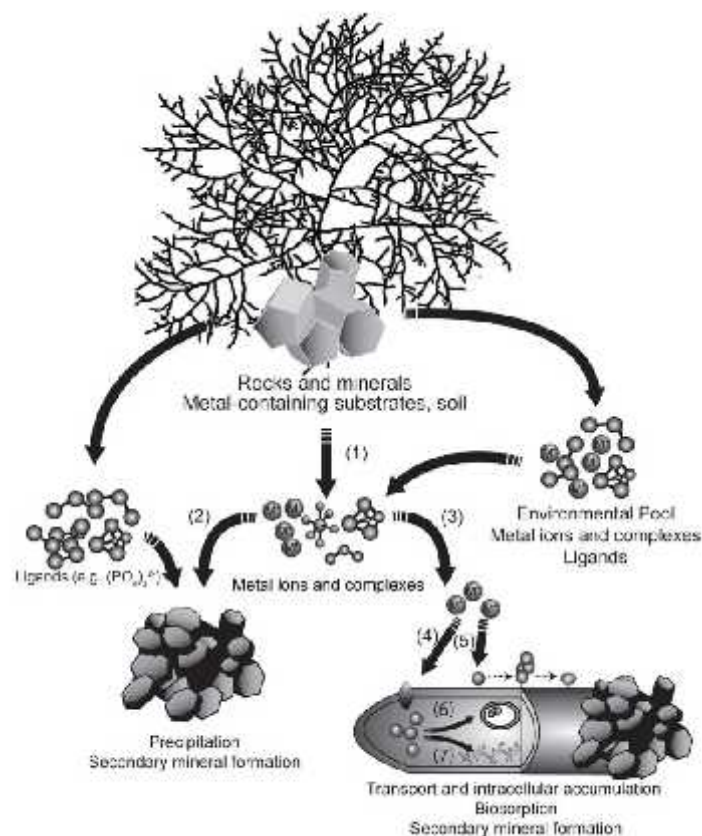
kolonizacija biljke pri povišenim razinama CO_2 (olakšana povećanom duljinom korijenja), izgleda da nema uinka na postotak kolonizacije korijenovih dlačica što ukazuje na povećanje gustoće ECM gljiva povezano s CO_2 . Nadalje, čini se da obogaćivanje s CO_2 ne mijenja značajno dugovječnost pojedinačnih vrhova korijenja s ECM gljivama. Slično je i što se tiče AM gljiva, sa značajnim povećanjem u postotku kolonizacije zapaženim u nekim travama, drveću i grmlju, ali neutralnim u incima u drugim travama i nekim zeljastim i drvenastim AM domaćinima. Specifični odgovori nekih vrsta, kao i s ECM gljivama, ukazuju na to da se promjene u strukturi zajednica AM gljiva zajedno s izmijenjenom izvanmatričnom micelijskom masom mogu predvidjeti pri uvjetima povišenog CO_2 (Cairney i Meharg, 1999).

Trenutno je nejasno u kojoj su mjeri očigledne razlike u odgovorima mikoriznih gljiva (u pogledu ukupne kolonizacije i strukture zajednice) povezane s razlikama u specifičnoj dostupnosti ugljika u korijenju određenog domaćina. Također, vjerojatno je da uočeni odgovori gljiva odražavaju i neizravne reakcije na promijenjene uvjete u tlu. Primjerice, izlučivanje iz korijenja može biti pod utjecajem CO_2 kao što može biti i izmjena tvari u korijenju. Dok potonje može imati neposredan utjecaj na dinamiku zajednice mikoriznih gljiva, oba mogu značajno djelovati na saprotrofne mikrobne organizme rizosfere i zbijenog tla i mogu utjecati na zajednice mikoriznih gljiva mijenjaju i interspecijske interakcije i izmijenjuju i procese u tlu. Štoviše, postoji jednoznačan dokaz da i populacije lankonožaca gražera poput skokuna mogu biti pod negativnim utjecajem povišenog CO_2 , potencijalno još više mijenjaju i zajednice mikoriznih i saprotrofnih gljiva. Sva dosadašnja istraživanja koja su proučavala uinke CO_2 na mikorizne zajednice bila su prilično kratkog vijeka (<3.5 godine, a u većini slučajeva značajno kraća). Prema tome, teško je predvidjeti da li će se zapažene promjene zajednica mikoriznih gljiva održati i u duljem razdoblju. Nadalje, glavna istraživanja u inaka CO_2 provode se na presadnicama koje su rasle u izolaciji. Takav pristup, iako pruža važne osnovne podatke, ne daje nikakav nagovještaj kako će reagirati zajednice gljiva povezanih s korijenjem razvijenijeg drveća ili utvrđene zajednice koje karakteriziraju korijenske sustave biljaka domaćina u prirodnim ekosustavima (Cairney i Meharg, 1999).

4. Tolerancija mikoriznih gljiva na djelovanje metala

Metali i njihovi spojevi mogu međudjelovati s gljivama na različite načine ovisno o vrsti metala, organizmu i okolišu, dok metabolička aktivnost također može utjecati na specijaciju i pokretljivost. Mnogi su metali neophodni za rast i metabolizam gljiva (npr. natrij, kalij, bakar,

cink, kobalt, kalcij, magnezij, mangan, željezo), ali svi mogu imati toksično djelovanje kada su prisutni u koncentracijama iznad određениh razina. Drugi metali (npr. kadmij, živa, olovo) nemaju nikakvu poznatu biološku funkciju, ali gljive ih akumuliraju. Toksičnost metala pod izraženim je utjecajem fizičko-kemijske prirode okoliša i kemijskog ponašanja određene vrste metala. Metali pokazuju toksičnost uinku na mnoge načine, npr. mogu blokirati funkcionalne skupine važnih bioloških molekula kao što su enzimi, premjestiti ili zamijeniti ione esencijalnih metala, uzrokovati raspad stanične membrane i membrana organela. Također, mogu međjelovati sa sustavima koji normalno pružaju zaštitu od štetnih uinko slobodnih radikala nastalih tijekom normalnog metabolizma. Unatoč otkoj toksičnosti, mnoge gljive preživljavaju, rastu i bujaju na metalima uinko istim lokacijama. Gljive posjeduju mnoga svojstva koja utječu na toksičnost metala, uključuju i proizvodnju proteina za vezivanje metala, organsko i anorgansko izlučivanje, aktivni transport i unutarstanično odjeljivanje (Slika 4.). Glavni građevni elementi staničnih stijenki gljiva (npr. hitin i melanin) imaju značajne sposobnosti vezivanja metala. Svi navedeni mehanizmi bitno ovise o metaboličkom i prehrambenom statusu organizma. Naime, one utječu na aktivnost mehanizama otpornosti ovisnih o energiji kao i na sintezu strukturnih sastavnica stijenki, pigmenata i metabolita, što nepovoljno utječe na dostupnost metala i odgovor organizma. Gljive su sposobne ograničiti ulaz toksičnih metala u stanice putem: smanjenog unosa metala i/ili povećanog izbacivanja metala; imobilizacije metala, npr. adsorpcijom na staničnoj stijenci i izvanstaničnim izlučivanjem sekundarnih novooblikovanih minerala poput oksalata; izvanstaničnog izoliranja metala pomoću, npr. egzopolisaharida i drugih izvanstaničnih metabolita (Gadd, 2007).



Slika 4. Mehanizmi tolerancije mikoriznih gljiva na toksi ne metale;

izvor: www.lifesci.dundee.ac.uk

Gljive tolerantne na metale mogu preživjeti zahvaljuju i svojim sposobnostima unutarstani ne kelacije pomo u, npr. metalotioneina i fitokelatina, i izolacije metala unutar vakuola. Vakuole gljiva imaju važnu ulogu u regulaciji koncentracije iona metala u citosolu i detoksikaciji potencijalno toksi nih metala. Metali koji se prioritetno izoliraju u vakuolama su: Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} kationi i jednovalentni K^{+} , Li^{+} i Cs^{+} kationi. Odsutnost vakuola ili funkcionalne vakuolarne H^{+} -ATPaze u gljivi *Saccharomyces cerevisiae* Meyen 1838 povezana je s pove anom osjetljivoš u i u velikoj mjeri smanjenim kapacitetom stanica za akumulaciju cinka, mangana, kobalta i nikla, metala ponajviše detoksiciranih u vakuoli. Što se ti e bakra i kadmija, ini se da unutarstani na detoksikacija pretežno ovisi o citosolnom izoliranju s induciranim molekulama za vezivanje metala. Me u njih spadaju niskomolekularni cisteinom bogati proteini (metalotioneini) i peptidi izvedeni iz glutathiona (fitokelatini). Dok se nazivaju fitokelatinima, takvi peptidi poznati su i pod nazivom kadistini i metal g-glutamil peptidi, iako je kemijska struktura, (gEC)nG, alternativni opis. Premda je poznato da su fitokelatini inducirani širokim rasponom iona metala, uklju uju i srebro, zlato,

živu, nikal, olovo, kositar i cink, vezivanje metala se pokazalo samo za njih nekoliko, prvenstveno bakar i kadmij. Iako bi glavna funkcija metalotioneina (kvaš evog MT-a) mogla biti stani na homeostaza bakra, indukcija i sinteza MT-a kao i duplikacija MT gena dovode do pove ane otpornosti na bakar i u *S. cerevisiae* and *Candida glabrata* (H. W. Anderson) S. A. Mey. & Yarrow 1978. Proizvodnja MT-a otkrivena je kod sojeva *S. cerevisiae* otpornih na bakar i kadmij. Me utim, treba naglasiti kako se i druge odrednice tolerancije pojavljuju u ovim i drugim organizmima, primjerice fenomen transporta, dok neki drugi organizmi poput *Kluyveromyces lactis* (Boidin, Abadie, J. L. Jacob & Pignal) Van der Walt 1971 ne mogu sintetizirati MT niti fitokelatine. Mehanizme opstanka prona ene u nemikoriznim gljivama izgleda koriste i ektomikorizne gljive. Oni uklju uju smanjenje unosa metala u citosol pomo u izvanstani ne kelacije kroz izb a ene ligande i vezanja za sastavnice stani nih stijenki. Unutarstani na kelacija metala pomo u niza liganda (glutathiona, metalotioneina) ili pove ano istjecanje iz citosola ili u izolirane odjeljke tako er su klju ni mehanizmi što omogu avaju toleranciju. Kapaciteti za izbacivanje slobodnih radikala kroz aktivnost superoksid dismutaze ili proizvodnju glutathiona još su jedan obrambeni mehanizam protiv toksa nih u inaka metala. Tvorba kompleksa kadmija pomo u fenolnih spojeva ili kompleksiranjem peptida poput metalotioneina vjerojatno je klju na odrednica stani nog odgovora na kadmij u gljivi *Paxillus involutus*. Zatim, može biti smanjena sinteza hidrofobina ime se Cys preusmjerava u tvornicu Cys-bogatih spojeva poput biomolekula za zaštitu od metala. Relativni nedostatak fitokelatina i prisutnost pretpostavljenog metalotioneina ukazuju na to da ektomikorizne gljive mogu koristiti mehanizam za toleranciju metala poput kadmija koji je razli it od onih u njihovim biljkama doma inima (Gadd, 2007).

Istraživanjem raspodjele sposobnosti otapanja toksa nih metala (u pogledu promjera zone otapanja) pokazalo se da su gotovo svi izolati (97%) mogli otapati cinkov fosfat. Polovina testiranih ektomikoriznih sojeva otapalo je bakrov fosfat, ali samo manji dio izolata (20-30%) otapao je kuprit i kadmijev fosfat. Nijedna od erikoidnih i ektomikoriznih gljiva nije pokazala sposobnost stvaranja iste zone u mediju sa sadržajem olova. Mikorizne kulture sposobne otapati minerale pokazale su vrlo razli ite aktivnosti za razli ite minerale. Vjeruje se da su manifestacija smrtonosnih u inaka i u inaka ko enja rasta minerala toksa nih metala te otapanje minerala u gljiva ovisni o vrsti jer su svi testirani izolati iste vrste pokazali sli an odgovor rasta na minerale ili sli nu sposobnost otapanja minerala (Fomina i sur., 2005).

Arbuskularne mikorizne gljive obi no su prisutne u bakrom one iš enim tlima. Korištenjem *in vivo* kultura *Claroideoglomus claroideum* N. C. Schenck & G. S. Sm. 1982 u zajednici s vrstom *Imperata condensata* Steud. te monokseni nih kultura (kultura nastalih

nasa ivanjem samo jedne vrste organizama na organizme doma ine) *Rhizophagus irregularis* u zajednici s korijenjem mrkve po prvi puta se pokazala prisutnost zelenoplavih AM spora u bakrom one iš enom tlu. U oba istraživanja broj zelenoplavih spora pove ao se s koncentracijom bakra u tlu ili mediju. Zelenoplava boja povezana je s akumulacijom bakra u citoplazmi metaboli ki neaktivne spore. Ovi podaci upu uju na to da je strategija opstanka gljiva u bakrom one iš enom tlu izolacija i odijeljivanje suvišnog metala u nekim sporama. Prisutnost iona bakra u citoplazmi spora otkrivena je uslijed stvaranja crvenog taloga nakon dodatka octene kiseline i kalijevog ferocijanida zdrobljenim plavim sporama. Vitalno bojenje spora sakupljenih iz *in vivo* i *in vitro* kultura pokazalo je da je pove anje razina bakra u tlu ili u mediju kulture dovelo do zna ajnog smanjenja vitalnosti spora. Zelenoplave spore imale su jedva primjetnu purpurnu boju koja je ukazivala na to da su spore bile mrtve. Otkri e da su, ak i pri primjeni najviših doza bakra, neke spore ostale vijabilne i u stakleniku i u monokseni nim kulturama upu uje na to da je jedna od strategija koje su AM gljive razvile kako bi opstale u bakrom one iš enim okolišima uskladištiti suvišan metal u nekim sporama, vjerojatno na taj na in štite i ostatak kolonije gljiva. Iako dobiveni podaci ukazuju na to da je zelenoplava boja spora zbog akumulacije bakra, identitet spoja je nepoznat. Uzevši u obzir središnju ulogu polifosfata u translokaciji fosfora tijekom simbioze, visoke koncentracije polifosfata sklonjenih u AM gljivama i ulogu polifosfata u detoksikaciji metala i toleranciji kod drugih organizama, lako je pretpostaviti kako zelenoplave spore mogu sadržavati mnogo polifosfata s vezanim bakrom. Alternativno, bakar bi mogao biti vezan s triacilglicerolima, glavnom skupinom spojeva za skladištenje ugljika u sporama AM gljiva (Cornejo i sur., 2013).

5. Literatura

- Cairney, J.W.G., Meharg, A.A., 1999. Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities. *Environmental Pollution* **106**, 169-182.
- Cornejo, P., Pérez-Tiend,a J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcón-Aguila,r C., Ferrol, N., 2013. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry* **57**, 925-928.
- Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Lounes-Hadj Sahraoui, A., 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology* **115**, 782-792.
- Finlay, R.D., 2008a. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1115-1126.
- Finlay, R.D., Lindahl, B.D., Taylor, A.F.S., 2008b. Chapter 13 Responses of mycorrhizal fungi to stress. In: *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*, **28** (British Mycological Society Symposia Series). Ed. Lynne Boddy, Juliet C. Frankland, Pieter van West, Academic Press, pp. 201-219.
- Fomina, M.A., Alexander, I.J., Colpaert, J.V., Gadd, G.M., 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 851-866.
- Frank, A.B., Trappe, J.M., 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* **15**(4), 267-275.
- Gadd, G.M., 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* **111**, 3-49.
- Laatikainen, T., Heinonen-Tanski, H., 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiological Research* **157**, 127-137.
- <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00134/full>
- <http://www.lifesci.dundee.ac.uk/people/geoff-gadd>
- http://www.nature.com/nrmicro/journal/v9/n3/fig_tab/nrmicro2519_F4.html
- <http://www.slideshare.net/HHFplanners/hawaii-native-plant-microbiome-manual>

6. Sažetak

Mikorizne zajednice temelj su uspješnog razvoja većine biljaka u različitim ekosustavima. Stoga, od velikog je značaja istraživanje utjecaja različitih tvari na mikorizne gljive, a osobito u pogledu bioremedijacije. U današnje vrijeme sve je više tvari antropogenog podrijetla koje imaju toksično djelovanje na mikorizne gljive. Mikorizne gljive posjeduju različite mehanizme tolerancije na stres izazvan onečišćenjem. Oslobađanje teških metala u tlo ovisi o raznim okolišnim uvjetima što znači da je negativni utjecaj na mikorizosfere bitno varijabilan. Stoga je potrebno bolje razumijevanje razine izdržljivosti do koje mikorizne gljive mogu podnositi stres bez nepoželjnih štetnih posljedica te mehanizme kojima mogu umanjiti štetan utjecaj toksikanata. Bolje je proučiti utjecaj zastupljenijih toksikanata u okolišu kao što su teški metali, međutim, nužna su istraživanja djelovanja i drugih skupina toksikanata na mikorizne gljive. Naposljetku, važno je naglasiti da unatoč tome što se provode mnoga istraživanja na navedenu temu s izolatima gljiva u laboratorijima, potrebno ih je još više izvoditi i u prirodnim uvjetima.

7. Summary

Mycorrhizal associations are essential for a successful development of most plants in various ecosystems. Therefore, it is highly important to study the effects of different substances on mycorrhizal fungi, especially in terms of a bioremediation. In modern days, a number of antropogenically generated substances which have toxic effects on mycorrhizal fungi is increasing. Mycorrhizal fungi have various mechanisms of tolerance to stress caused by pollution. The release of heavy metals in soil depends on various environmental conditions which means that the negative impact on mycorrhizospheres will be variable. Hence, better understanding of endurance levels of stress in mycorrhizal fungi is needed along the mechanisms by which they reduce the negative effects of pollutants. The effects of substances that are more common in environment such as heavy metals have been more studied, however, more research should be done to study the effects of other classes of pollutants. Finally, it is important to mention that even though a lot of research has been done on isolates of fungi in laboratories, even more studies in the natural environment have to be made on this topic.